

## 18. Terapia genică în cancer

*Terapia genică presupune o largă varietate de tipuri de tratament care utilizează materialul genetic în tratamentul cancerului.*

Aplicarea clinică a tehnologiei de transfer genetic este actual o formă acceptată, chiar dacă nu în totalitate, de tratament medical experimental. Aceasta a presupus elaborarea unor metode de inserare a unor gene în genomul celulelor canceroase cu ajutorul a diverse sisteme de transport sau folosirea altor tehnici care permit anularea expresiei genelor implicate în cancerogeneză sau utilizarea de acid nucleic ( fie ADN sau ARN) pentru a influența sinteza proteinelor. În teorie este posibil transformarea celulelor fie somatice sau germinale prin terapia genică, iar terapia genică poate fi întreprinsă atât *in vivo* ( modificarea celulelor în afara organismului sau *in vivo* ( în organism).

Terapia genică poate fi utilizată pentru:

- a restaura genele mutate: terapia cu gene supresoare, oncogene
- a induce acțiuni precum creșterea imunosupresei
- inhibarea expresiei anumitor gene.

În practică se realizează:

- transferul unor gene supresoare de tumori sau inactivarea oncogenelor prin mecanisme antisens;
- activarea selectivă a prodrugurilor prin inserarea în celulele tumorale a unor gene sensibile la aceste medicamente, numite și “gene suicidare”;
- metode de terapie imunogenică reprezentate de transferul unor gene pentru citokine, vaccinarea cu celule tumorale sau utilizarea unor molecule costimulatoare;
- anularea expresiei genelor prin intermediul ribozimelor (1,10).

### Utilizarea terapiei genice

#### *Genele supresoare tumorale*

Terapia genică este utilizată pentru restaurarea funcției genelor supresoare, derminând controlul ciclului celular. În condiții experimentale s-a demonstrat că restaurarea funcției genelor supresoare poate reversa fenotipul malign.

Pierderea funcției anumitor gene supresoare de tumori este considerată a fi responsabilă de pierderea semnalelor apoptotice în celulele tumorale și, ca urmare, de proliferarea lor necontrolată. De exemplu, multe tumori umane prezintă mutații ale genei supresoare p53 iar reinocularea acesteia în celulele canceroase este o modalitate terapeutică eficientă. Gena p53 a fost transportată, în special prin injectarea vectorilor adenovirali AdV-p53 direct în tumoră.

Câteva gene pot inhiba selectiv potențialul metastatic al celulelor tumorale precum genele *nm-23*, receptorul pentru fibronectină, conexina sau caderina E. De exemplu, gena *nm-23* codifică o proteină care codifică probabil alte proteine înrudite cu *ras*, iar reducerea expresiei sau deleția unei alele a acestei gene este asociată cu un potențial metastatic crescut în cancerul de sân și colorectal.

#### *Oncogene*

Scopul terapiei genice direcționate către oncogene este corectarea echilibrului dintre semnalele proliferative prin inhibiția funcției unor gene implicate în menținerea proliferării nerestricționate și dobândirea fenotipului metastatic.

Oncogenele dominante activate pot fi inactivate prin utilizarea unor mecanisme antisens: oligonucleotide antisens care împiedică transcripția prin legarea la alela sens, utilizarea unor molecule mARN antisens sau chiar a unor oligonucleotide care blochează transcripția prin legarea la ADN bicatenar, cu formarea unui triplu helix. Au fost dezvoltate aplicații clinice pentru inhibarea transcripției genei hibride *bcr/abl* sau pentru inhibarea căii *ras* cu ajutorul unor alele dominante negative. Eliberarea ARNm antisens în interiorul unei celule tumorale este mai eficientă decât utilizarea oligonucleotidelor antisens. Ținte investigate actual sunt: inhibiția oncogenei RAS, PTTG1 ( pituitary tumor transforming gene 1') și a subunității catalitice a TERT („telomerase reverse transcriptase”).

Construcția de antisens ARN a fost utilizată pentru a induce activitate tumoricidă pe liniile celulare de cancer pulmonar ce exprimă *K-ras*. Construcția retrovirală anti-*K-ras* determină reducerea tumorigenității la o linie celulară cu mutație homozigotă de *K-ras* la soarecii nud. Aceste observații au condus la efectuarea unor studii de injectare directă intra-tumorală de particule retrovirale anti-*K-ras* la pacienții cu cancer bronhopulmonar nerezecabile. Astfel, un adenovirus construit anti-*K-ras* a demonstrat, recent activitate anti-tumorală pe modelele murine inoculate cu linii celulare maligne umane.

Metodele utilizate pentru a inhiba expresia oncogenelor sunt:

- transferul nucleotidelor antisens prin secvențe genice scurte (antisense oligonucleotide), sau ADN în întregime.
- și ARN
- Expresia moleculelor sintetizate sau a anticorpilor anti-molecule care blochează funcția oncogenelor. intracelulare

### ***Gene care codifică enzime sau terapia prodrug-terapia cu "gene suicidare"***

**"Genele suicidare"** codifică de regulă o enzimă care transformă un pro-drog netoxic într-o moleculă toxică ce determină moartea celulelor în care sunt exprimate acestea. Cele mai studiate au fost gena pentru citozindeaminază (CD) a *Escherichia coli* asociată cu 5-fluorocitozină (5-FU) și gena pentru timidinkinază a virusului *Herpes simplex* (HSV-TK) asociată cu ganciclovir (GCV).

Genă CD care convertește 5-FU la 5-FU a fost utilizată în tratamentul metastazelor hepatice ale cancerelor gastrointestinale. Pentru transportul țintit al genei CD la nivelul metastazelor se pot utiliza promotori cu specificitate tisulară precum gena pentru  $\alpha$ -fetoproteină (AFP) sau pentru antigenul carcinoembrionar (CEA).

Un alt sistem utilizat este cel al genei HSV-TK. Celulele mamiferelor conțin o timidinkinază care poate fosforila numai nucleotidul timidină. HSV-TK poate fosforila însă și baza nucleozidului **ganciclovir**. Ca urmare, celulele transfectate cu HSV-TK pot fi ucise prin expunerea acestora la GCV. Această terapie a fost utilizată pentru numeroase tipuri de cancer precum mezoteliom, metastazele hepatice și peritoneale.

Strategiile de tratament incorporând șapte de ribonucleotide au fost testate în mai multe modalități, precum terapia "antisens"(ARN). Un exemplu sunt oligonucleotidele antisens împotriva *bcl-2*ARN. Molecula **oblimersen** a fost studiată în: leukemia limfoidă cronică (LLC), melanoma și alte malignități ca strategie de a crește sensibilitatea la apoptoză cu agenții chimioterapici convenționali. Alte abordări în curs de studiu includ transfecție cu vector viral (ARN sau ADN), injectarea ADN în tumoră și transfecția *ex vivo* în celulele tumorale selectate, celulele immune sau progenitori medulari (AND). Majoritatea acestor tehnici au demonstrat o oarecare eficacitate pe modele animale, iar studiile clinice sunt în curs. Nu a fost demonstrată o nici o eficacitate clinică totuși cercetările continuă.

### **Expresia unor gene citotoxice sau proapoptotice**

Este posibil să se selecteze transferul selectiv al genelor care pot determina distrucția celulelor canceroase prin mecanisme specifice fără a depinde de medicații exogene. Acest sistem acționează în majoritatea pe transferul genelor-țintă și a expresiei în celulele canceroase, utilizând liganți specifici sau promotori precum factorul de necroză tumorală (TNF) și a liganțului său implicat în inducerea apoptozei (TRAIL).

### **Probleme în terapia genică**

Securitatea terapiei genice este esențială astfel ca manipularea genică a celulelor somatice să nu fie transferată celulelor germinale, influențând urmașii.

Câteva probleme rămân de rezolvat în terapia genică:

- a) **durata scurtă a terapiei genice**- gena terapeutică introdusă în celula-țintă trebuie să rămână funcțională iar celulele care conțin gena terapeutică trebuie să funcționeze mai mult și să fie stabilă. Pacienții trebuie supuși unor runde multiple de terapie genică.
- b) **răspunsul imun** – există un risc de stimulare a sistemului imun și scădere a eficacității terapiei genice. Mai mult, sistemul imun crește răspunsul la vectorii virali făcând dificilă terapia genică.
- c) **probleme legate de utilizarea vectorilor virali**- virusurile prezintă o varietate de probleme potențiale pentru pacient precum: toxicitate, răspuns imun și inflamator neadecvat, controlul genelor și probleme legate de țintă; virusurile pot induce boala.
- d) **tulburări multigenetice**- cancerul survenit în urma mutațiilor într-o genă simplă sunt cel mai bine tratați prin terapia genică. De obicei, cancerul este rezultatul terapiei

genice multiple, efectul variațiilor genelor multiple și sunt astfel dificil de tratat eficace utilizând terapia genică.

- e) *carcinogeneza* -dacă o genă este integrată într-un loc neadevat în genom, precum o genă supresoare poate căpăta un potențial mutagen și induce tumori (1, 10,11,12).

### **Rezumat**

- Termenul de agenți *targeted* se referă la o clasă de medicații în creștere explozivă care țintesc căi specifice de semnal biologic la nivel molecular vitale pentru supaviețuirea celului maligne incluzând expresia genelor, reglarea creșterii, controlul ciclului celular, apoptoza și angiogeneza. Blocarea specifică a căilor de semnal biologic oferă avantaje atractive de terapie specifică a cancerului cu toxicitate redusă asupra țesuturilor normale comparativ cu chimioterapia.
- Acest grup de agenți este foarte disparat și include: moleculele mici tirozinkinazice și inhibitorii multikinazici, anticorpi monoclonali, inhibitorii proteozomici, histon-deacetilază, inhibarea angiogenezei, agenții de diferențiere, terapia genică și vaccinurile. Utilizarea agenților moleculari țintiți reprezintă o schimbare a dogmelor terapeutice în oncologie și au fost integrați progresiv în strategiile terapeutice actuale.
- Experiența clinică actuală consistentă cu inhibitorii kinazici, inhibitorii angiogenetici și anticorpii monoclonali a demonstrat capacitatea acestora de a induce răspunsuri tumorale, că aceștia nu sunt în general curativi și sunt asociați cu dezvoltarea rezistenței. În unele cazuri, acești agenți au schimbat profund istoria naturală a neoplaziilor ( ex. trastuzumab în cancerul mamar Her-2 pozitiv, rituximab în limfoamele maligne non-hodgkiniene, imatinib în GIST și sunitinib în cancerul renal metastatic).
- Medicația antiangiogenetică a devenit actual o realitate clinică tot mai accesibilă datorită introducerii unor noi agenți precum: bevacizumab, sorafenib și sunitinib.
- Asocierea chimioterapiei clasice cu terapia moleculară țintită a survenit a ca o nouă strategie în oncologia clinică și a devenit un standard de tratament în practica clinică pentru mai multe tipuri de neoplazii. Inițial, acești agenți au fost utilizați în tratamentul bolii avansate metastatice din care unii au demonstrat capacitatea de a prelungi supraviețuirea. Totuși impactul cel mai profund a fost observat în tratamentul adjuvant, unde au contribuit la terapia curativă (ex. prevenind recidiva) mai curând decât în paliativ. Totuși, utilizarea terapiilor moleculare au determinat creșterea considerabilă a costurilor în sănătate.
- Terapia genică în cancer poate fi utilizată în tratamentul cancerului pentru a interfera direct cu genele cancerului ( gene supresoare sau oncogene) sau se poate utiliza pentru a face celulele maligne mai sensibile la tratamentele anticanceroase sau la acțiunea sistemului imun. În prezent utilitatea clinică a terapiei genice rămâne limitată, dar unele studii randomizate sunt în curs de desfășurare.

### **Bibliografie**

1. Vandebroek A, Schrijvers D. Gene therapy. In Meestedt H, Schrijvers D, Bafaloukos D, Greil R (eds): *European Society for Medical Oncology Handbook of principles of translational research*. Informa Healthcare 2007:121- 127.
2. Ciuleanu TE. Terapia moleculară țintită și alte tratamente biologice. In Nagy Viorica (ed) *Principii de cancerologie generală*. Curs pentru studenți. Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca 2007: 139- 166.

3. Morgan RA. Gene therapy. In DeVita, Jr VT, Lawrence TS, Rosnberg SA, DePinho RA, Weinberg RA (eds): *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer-principles and practice of oncology*. 8th edition, Wolter Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008: 2967- 2978.
4. Murgo AJ, Kummar S, Gutierrez M, Tomaszewski JE, Doroshow JH. Principles of molecular targeted therapy: present and future. In Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG (eds) *Abeloff's Clinical Oncology*. Fourth Edition, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia PA 2008: 485- 500.
5. Skeel RT, Khleif SN. *Hanbook of cancer chemotherapy*. Wolters Kluwer/Lipincott Williams / Wilkins 2011: 16-44.
6. Hladnik LM, Wils AR, Augustin KM. Principles of systemic cancer therapy: molecularly targeted therapy. In Govondan R (ed): *The Washington Manual of Oncology*. Second edition, Wolter Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008: 33 – 46.
7. Colotta F, Mantovani A (eds) *Targeted therapies in cancer*. Miths or reality ? Springer ,, Advances in Experimental Medicine and Biology- vol 610, 2007: 54- 88.
8. Dietel M (ed) *Targeted therapies in cancer*. Springer- Heilderberg, New York 2007: 75- 85.
9. Darren DW, Herbst RS, Abbruzio JL (eds) *Antiangiogenetic cancer theraăy*. CRC Press, London 2007: 225- 238.
10. Kaufmann HL, Walder S, Antman K (eds) *Molecular targeting in oncology*. Humana Press 2008: 33 -55.
11. Miron L, Sandovici I- Terapia genică în cancer. In Miron L ( ed) *Oncologia generală*. Ed Egal, Bacău 2000: 310- 328.
12. Mc Kinney M, Morse M. Gene therapy and immunotherapy for cancer. In: Lyman GH, Cassidy J, Bisset D, Spence AJR, Payne M (eds). *Oxford American Handbook of Oncology*. Oxford University Press, New York 2009: 183-192.
13. Casciato DA. Cancer chemotherapy. In: Casciato DA (ed): *Manual of clinical oncology*. Sixth edition. Wolters Kluwer/ LippincottWilliams & Wilkins, Philadepphia 2009: 46- 99.
14. Soria JC, Blayz JY, Spano JP, Pivot X. Added value of molecular targeted agents in oncology. *Ann Oncol* 2011; 22: 1703-1716.